

Influência da vitrificação na incidência de ovócitos bovinos aneuplóides maturados *in vitro*.

Influence of vitrification on the incidence of bovine aneuploid oocytes matured in vitro.

LUNA, H.S.^{1*}; FERRARI, I.²; RUMPF, R.³

1. Professor do Departamento de Biociências da CPAQ-UFMS
 2. Professora da Faculdade de Medicina da UnB.
 3. Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- *Endereço para correspondência: hluna@ceua.ufms.br

RESUMO

O presente estudo objetivou verificar a incidência de aneuploidias em ovócitos bovinos vitrificados em diferentes períodos de maturação. Os ovócitos foram obtidos de ovários de abatedouro e divididos em cinco grupos: controle (ovócitos não vitrificados); grupos 0-h (vitrificados antes do começo da maturação); e grupos 8, 12 e 22 h (vitrificados respectivamente 8, 12 e 22 h após o começo da maturação). Os ovócitos permaneceram vitrificados por 24 h e então foram desvitrificados, completando 24 horas de maturação. Em seguida os ovócitos foram desnudados, fixados em lâmina e corados com orceína-acética. Nenhuma diferença foi encontrada ($P > 0,05$) entre o grupo controle (6,2%, 1/16) e grupos 0 h (22,0, 2/9), 8 h (22,0, 2/9), 12 h (25,0%, 3/12), 22 h (23,5%, 4/17). Os resultados sugerem que a vitrificação em diferentes períodos de maturação não influencia na taxa de aneuploidia.

Palavras-chave: Aneuploidia, Ovócitos, Bovino, Vitrificação.

SUMMARY

The present study aimed to verify the incidence of bovine aneuploid oocytes when vitrified at different maturation stages. Bovine cumulus-oocyte complexes were recovered from ovaries at a slaughterhouse and then divided into five groups: control group (unvitrified oocytes), 0 h group (composed of oocytes vitrified before the onset of maturation) and 8, 12, and 22 h groups (vitrified at 8, 12 and 22 h after the onset of maturation, respectively). The oocytes remained vitrified for 24 h, and then were thawed. In all groups, the oocytes completed 24 h of maturation. Subsequently, the cumulus cells were removed, and the denuded oocytes fixed on slides and stained with aceto-orcein. No differences ($P > 0.05$) on the incidence of aneuploid oocytes were observed between the control, nonvitrified group (6,2%, 1/16) and oocytes vitrified at 0 h (20,0%, 2/10), 8 h (22,0, 2/9), 12 h (25,0%, 3/12) or 22 h (23,5%, 4/17). These results suggest that the nuclear stage in which bovine oocytes are vitrified does not affect the incidence of aneuploid oocytes after completed 24 h of maturation.

Key words: Aneuploidy, Oocytes, Bovine, Vitrification.

INTRODUÇÃO

O estudo de alterações cromossômicas em gametas torna-se relevante uma vez que os sistemas de cultivo *in vitro* estão sujeitos à grande influência de variáveis externas. Entre outras, destacam-se choques térmicos, choques osmóticos, resfriamentos, meios de cultivo, hormônios, tempo de cultivo, pH, osmolaridade, antibióticos, luz e criopreservação (LECHNIAK, SWITONSKI e SOSNOWSKI, 1996; OCAÑA-QUERO *et al.*, 1999).

Várias espécies de animais domésticos foram estudadas com relação à frequência de aneuploidias, entre elas: bovinos, 5,8% (YADAV *et al.*, 1991); suínos, 11,9% (KOENIG e STORMASHAK, 1993); eqüinos, 5,5% (KING *et al.*, 1990); e camundongos, 2,7% (A`ARABI, ROUSSEL e CHANDLE, 1997). Em embriões, as aneuploidias são responsáveis por mais de 20% das alterações cromossômicas (KING, 1990).

O estudo citogenético de ovócitos apresenta-se como uma importante ferramenta no monitoramento de biotecnologias ligadas a programas de reprodução assistida. O ovócito é submetido a excessivas manipulações, sendo exposto a alterações nucleares e citoplasmáticas, que podem resultar em anormalidades cromossômicas. A criopreservação de gametas femininos é uma importante biotécnica para o estabelecimento de bancos de germoplasma animal, entretanto, limitados têm sido os sucessos obtidos em bovinos (FUKU, XIA e DOWNEY, 1995; MARTINO, SONGSASEN e LEIBO, 1996; SUZUKI *et al.*, 1996; CETIN e BASTAN, 2006). Também têm sido observadas alterações citogenéticas em ovócitos bovinos criopreservados (LUNA

et al., 2001). Assim, o presente estudo objetivou verificar o efeito da vitrificação na incidência de aneuploidias em ovócitos bovinos maturados *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de Ovários

Para o presente estudo foram colhidos ovários (n=188) provenientes de abatedouro local. Os ovários foram retirados imediatamente após o abate do animal e imersos em solução de PBS acrescido de 100 UI/ml de penicilina e 50 µg de estreptomicina a 37 °C. Em seguida, foram acondicionados em caixa térmica para transporte ao laboratório.

Aspiração Folicular e Maturação *In Vitro* (MIV)

Procedeu-se a aspiração de folículos ovarianos, cujas medidas variaram entre 2 e 8 mm. Foram considerados inadequados e, portanto, descartados os ovócitos que apresentavam reduzida quantidade de células da corona radiata, ausência das mesmas (desnudos) ou expansão. Os ovócitos selecionados foram introduzidos em placas de 4 poços, colocando-se, no máximo, 25 ovócitos por poço. Os ovócitos foram divididos em cinco grupos: controle (ovócitos não vitrificados); grupos 0-h (vitrificados antes do começo da maturação); e grupos 8, 12 e 22 h (vitrificados respectivamente 8, 12 e 22 h após o começo da maturação). Os ovócitos permaneceram vitrificados por 24 h e então foram descongelados e completaram 24 horas de

maturação. O meio de cultivo foi composto por TCM 199 sem HEPES (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) com 10% de Soro Fetal Bovino, 10 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH), 24 U.I. de hormônio luteinizante (LH) e 50 µg/mL de Gentamicina. A maturação foi realizada em estufa úmida com atmosfera controlada de 5% de CO₂ a 39 °C, por um período de 24 horas.

Vitrificação

Para vitrificação, os ovócitos foram expostos por 30 segundos na solução 1, composta por 10% de etileno-glicol, 10% de DMSO diluídos em meio de manutenção (TCM-199 com HEPES suplementado com 20% de soro fetal bovino). Após esse procedimento os ovócitos foram expostos por 25 segundos à solução 2, composta por 20% de etileno-glicol, 20 % de DMSO diluídos no meio de manutenção suplementado com 0,5 M de sacarose. Os ovócitos foram vitrificados pelo método *Open Pulled Straw* (OPS) (VAJTA *et al.*, 1997). Após desvitrificação, os ovócitos foram transferidos para solução composta por 0,25 M de sacarose, por 5 minutos, e então transferidos para solução composta por 0,15 M de sacarose, pelo mesmo período. Após remoção do crioprotetor, todos ovócitos foram colocados em estufa para completar a maturação *in vitro*.

Preparação Cromossômica

Após a maturação dos ovócitos, foram colocados em solução de hialuronidase a 0,3%, por 5 minutos, em estufa a 39 °C. As células da corona radiata foram removidas por repetidas pipetagens. Para a hipotonização e fixação dos ovócitos, utilizou-se a técnica descrita por Tarkoski

(1966) com modificações (ECTORS *et al.*, 1995).

Análise Citogenética

As lâminas foram coradas com orceína acética a 2%, por 30 segundos. A análise citogenética foi realizada em microscópio óptico com aumento de 1000X, como descrito por Yadav *et al.* (1991) e Lechniak e Switonski (1998).

A frequência de ovócitos aneuplóides foi calculada sobre o número de ovócitos hiper-haplóides que apresentavam adequado espalhamento dos cromossomos e ausência de sobreposição. Todos os ovócitos hipo-haplóides (que apresentaram < 30 cromossomos) foram descartados do estudo.

Análise Estatística

Para cada tratamento, foram realizados cinco repetições. Para analisar os dados foi utilizada a transformação arcsen. Em seguida foi realizado análise de variância (ANOVA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados relacionados às aneuploidias encontrados estão apresentados na Tabela 1. Em todos os grupos do experimento, das 174 metáfases II haplóides obtidas, 64 metáfases (36,7%), permitiram análise dos cromossomos. As metáfases II hipo-haplóides foram descartadas. Este procedimento tem sido recomendado devido a possibilidade de perdas cromossômicas durante a fixação (YADAV *et al.*, 1991; TIVERON *et al.*, 1992; LECHINIAK e SWITONSKI, 1998).

No grupo controle foi encontrado apenas 1 ovócito hiper-haplóide, entre os 16 analisados (6,2%). No grupo 0 h, foi observada a presença de 2 ovócitos hiper-haplóides dos 10 analisados (20,0%). No grupo 8 h, 2 ovócitos hiper-haplóides dos 9 analisados (22,0%). No grupo 12 h, dos 12 ovócitos analisados, observou-se 3

hiper-haplóides (25,0%) e, finalmente, dos 17 ovócitos analisados no grupo 22 h foram observados 4 ovócitos hiper-haplóides (23,5%). O teste estatístico aplicado não mostrou diferença significativa ($P>0,05$) entre os grupos controle e vitrificados.

Tabela 1. Incidência de aneuploidia nos ovócitos vitrificados em diferentes tempos de maturação.

Grupos	Metáfases Analisadas	Metáfases com 30 cromossomos (%)	Hiper-haplóide >30 cromossomos (%)
Controle	16	15 (93,7)	1 (6,2)
0-h	10	8 (80,0)	2 (20,0)
8-h	9	7 (77,7)	2 (22,2)
12-h	12	9 (75,0)	3 (25,0)
22-h	17	13 (76,4)	4 (23,5)

Estudos cromossômicos em ovócitos bovinos mostram que a frequência de aneuploidia pode variar de 3,8 a 7,1 % em ovócitos maturados *in vitro*, sem processo de resfriamento ou criopreservação (LECHNIAK e SWITONSKI, 1998; YADAV *et al.*, 1991; LUNA *et al.*, 2000). Os ovócitos criopreservados no presente estudo não mostraram aumento significativo de aneuploidias quando comparados ao grupo controle. Apesar do número de ovócitos analisados ser relativamente baixo, esses resultados vêm corroborar para alguns estudos citogenéticos de ovócitos criopreservados. Bouquet *et al.* (1992) realizaram estudo citogenético em ovócitos de camundongo onde encontram 4,6% de hiper-haploidia no grupo controle e nenhum ovócito hiper-haplóide no grupo criopreservado.

Vários estudos indicam que a criopreservação de ovócitos não leva a aneuploidias em embriões oriundos de ovócitos criopreservados (BOUQUET, SELVA e AUROUX, 1992; BOUQUET, SELVA e AUROUX, 1995). Entretanto,

a criopreservação pode levar a anormalidades no fuso meiótico e aumentar os riscos de aneuploidias (GLENISTER *et al.*, 1987). Por outro lado, estudos mostram que a morfologia normal do fuso pode ser recuperada em 1 hora de cultivo após o descongelamento (AIGNER *et al.*, 1992). No presente estudo, em todos os grupos experimentais, os ovócitos retornaram ao cultivo por no mínimo 2 horas (grupo 22-h) e, no máximo, 24 horas (grupo 0-h). Esse fato, provavelmente, permitiu a reorganização do fuso, evitando a ocorrência de taxas elevadas de aneuploidias, uma vez que o fuso é muito sensível a variações de temperatura.

Luna *et al.* (2001) verificaram aumento de metáfases II diplóides ocasionadas, certamente, pela retenção do primeiro corpúsculo polar em ovócitos bovinos vitrificados antes do começo da maturação ou 8 horas após. Tal fenômeno pode ter ocorrido pelo fato de que nestes períodos de congelamento o fuso se encontra em desenvolvimento, podendo haver alterações que impossibilitem a

eliminação do primeiro corpúsculo polar. Contudo, não foram obtidos os mesmos resultados com relação às aneuploidias. A não ocorrência de aneuploidias poderia ser atribuída aos ovócitos que conseguiram re-organizar a estrutura do fuso e terminar a meiose sem alterações cromossômicas.

É de fundamental importância o estudo dos sistemas de maturação de ovócitos bovinos, em particular, os submetidos ao

processo de criopreservação, a fim de se verificar possíveis aumentos nas taxas de alterações cromossômicas que poderão afetar os índices de concepção, resultando em perdas embrionárias. O estudo mostrou que ovócitos bovinos vitrificados antes do começo da maturação *in vitro* ou 8, 12 e 22 horas após o começo da maturação não apresentam aumento da incidência de aneuploidias.

REFERÊNCIAS

- A`ARABI S.Y.; ROUSSEL, J.D.; CHANDLER, J.E. Chromosomal analysis of mammalian oocytes matured in vitro with various culture systems. **Theriogenology**, v.48, p.1173-1183, 1997.
- AIGNER, S.; VAN DER ELST, J.; SIEBZEHRUBL, E.; EICHENLAUB-RITTER, U.; WILDT, L.; VAN STEIRTEGHEM, A. The influence of slow and ultrarapid freezing on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. **Hum. Reprod.**, v.7, p.857-864, 1992.
- BOUQUET, M.; SELVA, J.; AUROUX, M. The incidence of chromosomal abnormalities in frozen-thawed mouse oocytes after in-vitro fertilization. **Hum. Reprod.**, v.7, n.1, p.76-80, 1992.
- BOUQUET, M.; SELVA, J.; AUROUX, M. Effects of cooling and equilibration in DMSO, and criopreservação of mouse oocytes, on rates of in vitro fertilization, development, and chromosomal abnormalities. **Mol. Reprod. Devel.**, v.40, p.110-115, 1995.
- ECTORS, F.J.; KOULISCHER, L.; JAMAR, M.; HERENS, C.; VERLOES, A.; REMY, B.; BECKERS, J-F. Cytogenetic study of bovine oocytes matured in vitro. **Theriogenology**, v.44, p.445-450, 1995.
- CETIN, Y.; BASTAN, A. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. **Anim. Reprod. Sc.**, v.92, p.29-36, 2006.
- FUKU, E.; XIA, L.; DOWNEY, B.R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.32, p.139-156, 1995.
- GLENISTER, P.H.; WOOD, M.J.; KIRBY, C.; WHITTINGHAM, D.G. Incidence of chromosome anomalies in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized in vitro. **Gamete Res.**, v.16, p.205-216, 1987.
- KING, W.A.; DESJARDINS, M.; XU, K.P.; BOUSQUET, D. Chromosome analysis of horse oocytes cultured in vitro. **Genet. Sel. Evol.**, v.22, p.151-160, 1990.
- KING, W.A. Chromosome abnormalities and pregnancy failure in domestic animals. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.**, v.22, p.151-160, 1990.
- KOENIG, J.L.F.; STORMSHAK, F. Cytogenetic evaluation of ova from pubertal and third-estrous gilts. **Biol. Reprod.**, v.49, p.1158-1162, 1993.

LECHNIAK, D.; SWITONSKI, M.;
SOSNOWSKI, M. The incidence of bovine
diploid oocytes matured in vitro.

Theriogenology, v.46, p.267-277, 1996.

LECHNIAK, D.; SWITONSKI, M.
Aneuploidy in bovine oocytes matured in
vitro. **Chromosome Res.**, v.6, p.504-505,
1998.

LUNA, H.S.; FERRARI, I.; LUNA, H.;
RUMPF, R. **The frequency of chromosomal
abnormalities in bovine oocyte matured in
vitro.** In: GLOBAL CONFERENCE ON
CONSERVATION OF DOMESTIC
ANIMAL GENETIC RESOURCES, 5. 2000,
Brasília. CD ROM..

LUNA, H.S.; FERRARI, I.; RUMPF, R.
Influence of stage of maturation of bovine
oocyte at time of vitrification on the
incidence of diploid metaphase II at
completion of maturation. **Anim. Reprod.
Sc.**, v.68, p.23-28, 2001.

MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO,
S.P. Development into blastocysts of bovine
oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling.
Biol. Reprod. v.54, p.1059-1069, 1996.

OCAÑA-QUERO, J.M.; PINEDO-MERLÍN,
M.; MORENO-MILLÁN, M. Influence of
follicle, medium, temperature and time on the
incidence of diploid bovine oocytes matured
in vitro. **Theriogenology**, v.51, p.667-672,
1999.

SUZUKI, T.; BOEDIONO, A.; TAKAGI,
M.; SAHA, S.; SUMANTRI, C. Fertilization
and development of frozen-thawed germinal
vesicle bovine oocytes by a one-step dilution
method in vitro. **Cryobiology**, v.33, p.515-
524, 1996.

TARKOSKI, A.K. An air-drying method for
chromosome preparations from mouse egg.
Cytogenetics, v.5, p.394-400, 1966.

TIVERON, C.; MARCHETTI, F.;
BASSANI, B.; PACCHIEROTTI, F.
Griseofulvin-induced aneuploidy and meiotic
delay in female mouse germ cells.
Cytogenetic analysis of metaphase II oocytes.
Mutation Res., v.266, p.143-150, 1992.

YADAV, B.R.; KING, W.A.; XU, K.P.;
POLLARD, J.W.; PLANTE, L. Chromosome
analysis of bovine oocytes cultured in vitro.
Genet. Sel. Evol. v.23, p.191-196, 1991.

VAJTA, G.; BOOTH, P.J.; HOLM, P.;
GREVE, T.; CALLESEN, H. Successful
vitrification of early stage bovine in vitro
produced embryos with the open pulled straw
(OPS) method. **Cryo-Letters**, v.18, p.191-
195, 1997.